

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Constantine I
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale



Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie Animale

Spécialité : Génétique Moléculaire

Intitulé :

Etude du stress acide et osmotique

Chez les bactéries lactiques

Présenté et soutenu par : TAIRALILE Sana

le : 23/06/2014

ZOUYED Massika

Jury d'évaluation :

Présidente du jury: S. BECHKRI

Maitre Assistante « A » - Université Constantine 1

Rapporteur : R. GHARZOULI FERTOUL

Maitre de Conférence « B » - Université Constantine 1

Examinatrice : M. SAOUDI BOULALA

Maitre Assistante « A » - Université Constantine 1

Année universitaire
2013 - 2014

Année universitaire : 2013 – 2014.

**Présenté par : TAIRALILE Sana
ZOUYED Massika**

Titre du mémoire

Etude de la réponse au stress acide chez les bactéries lactiques

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie Animale
Option : Génétique Moléculaire**

Résumé :

Nous avons étudiés l'adaptation aux variations de l'environnement qui est essentiel à la survie et au développement des bactéries.

Ce mémoire a pour objet de comprendre les mécanismes de réponse au stress acide chez les bactéries lactiques.

Les modifications environnementales conduisant à des conditions de croissance non favorables. Le stress acide est le principal stress qui menace la croissance des bactéries lactiques. Ce stress a un effet sur la morphologie, la croissance et la survie des bactéries lactiques. Pour son adaptation, la bactérie doit procéder à une série de réponses génétique.

Quatre mécanismes de régulation contrôlent l'expression de plus de stress. Trois de ces mécanismes, ont été caractérisés ils impliquent le facteur sigma B (δB) et les répresseurs transrationnels HrcA et CtsR. Le facteur δB régule l'expression des gènes de stress dits de classe II tandis que les gènes de stress dont l'expression est contrôlée par les régulateurs HrcA et CtsR appartiennent respectivement à la classe I et III, leur transcription requérant le facteur δB .

En effet, ce régulateur intervient dans le contrôle de l'expression des opérons groESL et dnaK ainsi que des gènes clpP, clpC, clp12 et hsp18. L'expression du gène clpX semble faire intervenir un autre système de régulation non caractérisé à ce jour.

Mots clés :

Bactéries Lactiques, Stress Acide, Stress Osmotique, Réponse au Stress, Régulation Génétique.

Structure de recherche :

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire.



REMERCIEMENT



Nous remercions tout d'abord ALLAH, le Clément, le Miséricordieux le très Miséricordieux de nous avoir guidé et toujours soutenu, volonté et pour son aide À durant toute notre vie et nos années d'étude. Paix et salut soit sur son prophète Mohamed (SAW) qui sera toujours pour nous un modèle.

*Au terme de la réalisation de ce mémoire, nous tenons à remercier :
Notre encadreur Dr : **MmeGHARZOULI R**, maitre de conférences
à l'institut des science de la nature et de la vie, université Constantine 1, pour
Avoir*

*Dirigé et supervisé ce modeste travail, ainsi que pour sa patience avec nous, son
Aide, et sa grande
Gentillesse, ses conseils précieux et sa disponibilité entière toute au long de période de
Travail et aussi Particulièrement la dernière année universitaire ;*

***Mme. BECHKRI S**, pour avoir aimablement accepté de présider le jury de
soutenance ;*

***Mme. SAOUDI M**, pour avoir aimablement accepté examiner le présent mémoire
Nous remercions sincèrement tous ceux qui nous ont aidés et ainsi toute personne
ayant participé de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.*

Merci à tous



Dédicace

Je remercie en premier lieu mon DIEU ALLAH le tout puissant et miséricordieux qui me donne les moyens et les efforts qui m'ont permis qu'enous finisse se travail qu'est la clôtüre d'une première étape de ma vie.

Je dédie ce modeste travail avec toute ma gratitude:

**A la mémoire de mon père « Mouloud » qui m'avait souhaité
Ce jour-là mais malheureusement il est à cote de Dieu.**

**A celle qui m'a transmis la vie, l'amour, le courage, à toi chère
Maman « Akila » avec ma profonde gratitudes pour tous leur
Sacrifices, consentements appuis et leur espoirs.**

A ma seul sœur : « Hakima »

A mes frères : « Riad » « Wahid » « Samir »

**Et surtout les jumeaux « Anoir et Aymen » ceux qui j'aime
Beaucoup**

A ma grand-mère.

A mes oncles paternels et maternels.

**A tous ma famille loin et proche surtout Nassima, Saliha,
Yassmina, Karouma et Rokia, Sami et son jumeaux Ayham
Etryhame.**

**A tous mes amies proches : Afaf, Ahlem, Djawida, Fatima,
Kenza, Khroufa, Leila, Moufida, Mouna,
Mouna Géné, Rahima, Selwa, Wafa, Wafia, Warda
et surtou mes amies dans la cité Aicha oume el**

Mouaminine: Amani, Bouchra, Besma, Hadjer, Maha, Roumaissa.

**A tous mes collègues de la promotion Master II Génétique
Moléculaire/Option 2 surtou Faty, Fatima, Houda, Roukia, Saida et qui
je n'oublie pas A mon Binôme ma chères « Sana » qui sacrifier avec moi
pour faire ce travail.**

**Et toujours je pris mon Dieu de les gardes et de les
protéger.**

MASSIKA



Dédicace

Merci mon DIEU de m'avoir permis d'arriver jusqu' ici et de m'avoir donné l'aptitude d'achever ce modeste travail.

Je dédie se travail à tous ma gratitude :

Ceux qui j'ai tant aimé avec beaucoup d'affection et que je suis très fière de les avoir comme parent et que tous les mots du monde ne peuvent exprimes l'amour et le respect que je leur porté ma mère «ZEINEB» et mon père « AHMED » et pour leurs soutien et leurs sacrifices énormes.

A mes très chers frères : AMAR, BILEL, MOUHAMED et HICHAM

A mes très chères sœurs : AHLEM, WASSILA, et ma petite sœur AMINA

A les épouses des mes frères : MERIEM, RIMA et surtout FATIMA

A les paires des mes sœurs : MOUHAMED et MOUSSA

A les fils de ma sœur : RAID , ZAKARIA et KHADIJA

A mon très cher mari : ADEL

A tous ma famille loin et proche surtout mes oncles et mes tantes paternels et maternels.

A tous mes amies proches : SOUMIA, NAWEL

A tous mes collègues de la promotion Master II Génétique moléculaire /Option2

Et surtout DJALILA, KHAWLA, FATIMA, SAIDA et NADJET

A que je n'oublie pas mon binôme ma chère Massika qui sacrifier avec moi pour faire ce travail.

Et toujours je pris mon Dieu de les gardes et de les protéger.

Sana



Sommaire

Liste des abréviations

Introduction.....	01
-------------------	----

CHAPITRE I :

I. Généralités sur les bactéries lactiques.....	
I.1.Définition.....	03
I.2.Origine.....	03
I.3.Caractères généraux des bactéries lactiques.....	03
I.4.Taxonomie des bactéries lactiques.....	04
I.5.Facteurs influençant la croissance des bactéries lactiques.....	04
I.5.1. Milieux de culture.....	05
I.5.1.1. Source de carbone utilisable.....	05
I.5.1.2. Besoin en acide aminés.....	05
I.5.1.3. Besoin en vitamines.....	06
I.5.1.4. Besoin en base azoté.....	06
I.5.1.5.Besoin en éléments minéraux.....	06
I.5.2.Enzymes et métabolismes.....	06
I.5.2. a. Le pH.....	07
I.5.2.b. La température.....	07
I.5.3. Effet de L'oxygène.....	08
I.6. Les principaux rôles des bactéries lactiques en panification.....	08
I.7. Production des bactéries lactiques pour l'industrie agro-alimentaire.....	08

CHAPITRE II :

II. Généralités sur le Stress.....	
II.1. Comment étudier un stress ?.....	12
II.2. Définition.....	12
II.3. Modalité d'application du stress.....	12
	12

II.3.1. Stress prolongé.....	12
II.3.2.Stress de type choc.....	13
III. Effet de stress acide sur les bactéries.....	13
III.1. Effet sur la morphologie.....	14
III.2. Effet sur la croissance.....	14
III.3. Sur la survie.....	15
CHAPITRE III :	
IV. La réponse au stress.....	16
IV.1.Modalité de réponse a quelque stress unitaires.....	16
IV.1.1. Contrainte thermique.....	17
IV.1.1.a.stress thermique chaud.....	17
IV.1.1.b. Adaptation au froid chez les bactéries lactiques.....	18
IV.1.1.b.1. Effet du froid sur la croissance des bactéries lactiques.....	18
IV.1.1.b.2 Les protéines induites par le froid.....	18
IV.1.2.Contrainte acide.....	19
IV.1.3.Contrainte osmotique.....	20
IV.1.4.Contrainte oxydatif.....	21
IV.2.Les régulateurs globaux de la réponse aux stress.....	21
CHAPITRE IV :	
V. Le stress osmotique.....	25
V.1 Définition.....	25
V.1.1.L'osmose.....	25
V.1.2.Le stress osmotique.....	25
V.2.Effet de stress osmotique sur les bactéries.....	25
V.3.La réponse au stress osmotique.....	26
Conclusion :	
Conclusion.....	28
Références bibliographiques :	
Références bibliographiques.....	29
Résumé	

Liste des abréviations

EMP : d'Emden Meyerhof Parnas (les voies métaboliques)

ATP: Adénosine Tri-Phosphate

PTG: PeptidoGlycan

PH : Potentiel d'Hydrogène

PHi : Potentiel d'hydrogène interne

GSP : protéines Générales de Stress

SSP : Protéines Spécifiques d'un Stress

HSP: heatshockprotein

CIP : Cold Induced Protein (protéine induite par le froid)

CSP : Cold Shock Protein (protéine de choc froid)

Lb: *Lactobacillus*

Lc: *Lactococcus*

Oe: *Oenococcus*

Pc: *Pediococcus*

E: *Escherichia*

B : *Bacillus*

ATR : Acide Tolérance Réponse

ASP : Acide Stress Proteins

ADI : Arginine Déiminase

Gad : Glutamate Décarboxylase

ROI : Intermédiaires Réactifs de l'Oxygène

ROS : Réactive Oxygène Species

Introduction

Introduction

Couramment employé dans le langage quotidien, le terme de stress n'est pourtant pas clairement défini et relève plus du concept que du phénomène réel. Du point de vue de l'homme, le mot stress est utilisé à tout va pour définir une sensation, un ressenti par rapport à une agression extérieure qu'elle soit de nature physique ou, plus souvent, émotionnelle.

Pour les microorganismes, auxquels nous nous intéressons dans ce mémoire: c'est les bactéries lactiques qui constituent un groupe hétérogène qui rassemble des bactéries capable de produire de l'acide lactique par un métabolisme fermentaire (Rigaux, 2008). Le terme de stress bactérien est défini comme une condition hostile qui tend à empêcher un système de fonctionner de façon optimale. Toutefois, si on se limite à cette assertion, il reste à définir l'état optimal aussi, le stress peut être considéré comme l'ensemble des conditions qui provoquent des changements de processus physiologiques conduisant éventuellement à une inhibition de croissance voir en dommages cellulaires ces changements imposent à la cellule de développer des mécanisme de résistance qui permettent la survie ou simplement une meilleure croissance (Booth, 2002).

Les bactéries lactiques sont fréquemment exposées à des variations des propriétés physicochimiques du milieu environnant: la température, l'osmolarité ou encore l'acidité de ce milieu qui y sont constamment confrontées, ont développé des réponses adaptés à ces variations (Özer *et al.*, 2009)

Ces réponses font l'objet d'études académiques depuis plus de vingt ans pour améliorer les fabrications industrielles. Outre de son intérêt fondamental, l'étude des mécanismes de protection contre les stress chez les bactéries est aussi nécessaire pour une utilisation optimale de celles-ci dans les procédés industriels (Essaid *et al.*, 2009).

Notre objectifs s'inscrit de :

- Le stress acide et la modalité d'application de stress (stress prolongé et type choc).

- Mettre en évidence l'adaptation des bactéries lactiques aux conditions environnementales et la différente contrainte thermique, acido-basique, osmotique et oxydative.
- Nous présentons en particulier comment l'information génétique est utilisée pour développer les principale fonctions de la cellule a régulée globalement de la réponse au stress ?
- Et enfin nous avons également abordé le stress osmotique chez la bactérie lactique qui devrait permettre de comprendre comment la bactérie répond à ce stress ?

Chapitre I

I. Généralité sur Les bactéries lactiques

I.1. Définition

On considère comme bactérie lactique, toute bactérie capable d'excréter l'acide lactique à partir d'un substrat glucidique (lactose, glucose...) , en empruntant les voies métaboliques ; d'Embden Meyerhof Parnas (EMP) dans laquelle l'acide lactique est le seul produit excrété à partir du substrat (Homofermentation) , ou la voie de Dickens-Horecker et d'Etner Doudoroff conduisant à l'acide lactique en mélange avec d'autres produits tels que CO₂, acide acétique, éthanol (Hétéro fermentation) , et ayant une signification et application technologique en industrie alimentaire (Leveau et Bouix, 1980) .

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes assez hétérogènes sur le plan morphologique et physiologique. Selon Deroissart (1986), les bactéries lactiques sont des cellules vivantes qui puisent de l'énergie de leur environnement pour entretenir leur structure. Elles ont besoin de sources de carbone relativement complexes pour élaborer leurs biomolécules, et requièrent comme source énergétique des molécules organiques et ne se développent qu'en présence de substances hydrocarbonées telles que les sucres, alcools et acides organiques.

I.2. Origine

Les bactéries lactiques sont isolées à partir de nombreux milieux naturels : végétaux (plantes et fruits), animaux et humains (cavité buccale et vaginale, fèces, lait...) (London, 1976 cité par Deroissart, 1986).

Certaines espèces sont adaptées à un environnement spécifique :

- ❖ Espèces du genre *Streptococcus* : Se trouvent surtout chez l'homme, Les animaux et oiseaux, d'autres espèces ont été isolées à partir des plantes.
- ❖ Espèces du genre *Lactobacillus* : Se rencontrent dans la nature ou elles sont associées aux plantes, animaux et humains.

Les bactéries lactiques se trouvent généralement associées à d'autres micro-organismes dans de nombreux produits d'origine animale et végétale fermentés ; lait fermentés (fromage, beurre...) (London, 1976 cité par Deroissart, 1986).

I.3. Caractères généraux des bactéries lactiques

Décrites pour la première fois par Orla-jensen au début du XXe siècle, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique. (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet *et al.*, 2005)

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes.

Elles sont Gram positives, généralement immobiles, nonsporulées et ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio *et al.*, 1994).

Elles sont des coques ou des bâtonnets, catalase négative et généralement nitrate réductase négative. Elles synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides.

Les bactéries lactiques sont aéro-anaérobies facultatives ou micro-aérophiles. En présence d'oxygène, elles sont incapables de réaliser une phosphorylation oxydative car elles ne peuvent pas synthétiser les cytochromes et les enzymes à noyau hème (Larpen, 1989).

Elles rassemblent en effet 12 genres qui se caractérisent par la production, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres dont : *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*.

La fermentation est dite : homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétéro lactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO₂...etc.) (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet *et al.*, 2005).

I.4. Classification et taxonomie

Famille : *Lactobacillacea*

Classe : *Bacilli*

Ordre : *Lactobacillales*

Genres : *Lactococcus*

Espèce : *Lactococcus lactis* sp. *lactis* (Konig et Frohlich, 2009).

Depuis la description du *Bacterium Lactis* (actuellement *Lactococcus Lactis*), la taxonomie des bactéries lactique est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dix dernières années. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre (Pot, 2008).

La taxonomie a longtemps reposé sur les critères morphologiques et biochimiques permettant de différencier les espèces et de caractériser des variantes au sein d'une même espèce. Ainsi des études basées sur les critères moléculaires (la détermination de la composition des peptidoglycanes (PTG), la composition de l'ADN mesurée par hybridation G-C%) ont permis d'identifier des espèces et des sous espèces.

Cependant, les espèces des genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ou *Streptococcus*, dont le G-C % de l'ADN est inférieur à 50 %, peuvent être regroupées dans la branche des *Clostridium* avec *Bacillus* et séparées de la branche des *Actinomycètes* au G-C % est supérieur à 50 %, comprenant *Propionobacterium* et *Bifidobacterium* (Stackebrandt *et al.*, 1983, Kandler et Weiss, 1986, Stackebrandt et Teuber, 1988).

La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classifier les genres des bactéries lactique. De ce fait, les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobactérium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella*, récemment décrit est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (Collins *et al.*, 2007).

I.5.Facteurs influençant la croissance des bactéries lactiques

I.5.1.Milieux de culture

Les bactéries lactiques présentent de nombreuses exigences nutritionnelles, ce qui nécessite l'usage de milieux de culture « riches » (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1995).

I.5.1.1. Source de carbone utilisable

La croissance nécessite, en premier lieu, la présence d'une source d'énergie. Dans le cas des bactéries lactiques, ce sont principalement des glucides (monosaccharides, disaccharides, pentoses, hexitols et pentitols) qui font office de substrat énergétique.

La nature des glucides assimilables varie selon l'espèce considérée, et on observe souvent des différences entre souches appartenant à une même espèce. De plus, la vitesse de croissance des bactéries lactiques dépend de la source glucidique présente dans le milieu(Cocaign-Bousquet *et al.*, 1995).

I.5.1.2. Besoin en acide aminés

Pour une même souche, les besoins en acides aminés varient également en fonction de la nature des autres acides aminés présents dans le milieu de culture. Par exemple, *Streptococcus thermophilus* est capable de se développer dans un milieu chimiquement défini dépourvu de cystéine ou de méthionine, mais pas en cas d'absence simultanée de ces deux composés(Cocaign-Bousquet *et al.*, 1995).

Dans le lait, les bactéries lactiques utilisent les acides aminés libres ainsi que ceux présents dans les peptides et protéines. La croissance des bactéries lactiques y est souvent stimulée par l'ajout d'ingrédients riches en acides aminés et en petits peptides (extrait de levure, peptones)(Cocaign-Bousquet *et al.*, 1995).

I.5.1.3. Besoin en vitamines

Les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser certaines vitamines indispensables à leur croissance. Celles-ci doivent alors être fournies par le milieu de culture.

Dans les études nutritionnelles, on distingue les vitamines dont le besoin est absolu, celles qui stimulent la croissance et celles ayant peu d'effet sur la croissance. Les exigences sont très variables, y compris au sein d'une même espèce. De plus, les résultats obtenus par les différents auteurs sont souvent contradictoires(Cocaign-Bousquet *et al.*, 1995 ; Van Niel et Hahn-Hagerdal, 1999).

I.5.1.4. Besoin en base azoté

Plusieurs études mentionnent des exigences en bases azotées. De telles exigences proviennent de l'absence d'enzymes impliquées dans le métabolisme des pyrimidines et des purines (Horvarth *et al.*, 2000).

I.5.1.5. Besoin en éléments minéraux

Le magnésium est le principal cation divalent présent dans les cellules vivantes. Il a de multiples fonctions, parmi lesquelles le rôle de cofacteur de réactions enzymatiques et la participation à la stabilisation des acides nucléiques. Sa présence dans les milieux de culture est donc indispensable (Boyaval, 1989).

Le manganèse est essentiel pour la croissance de *Leuconstoc mesenteroides* et des lactobacilles. En plus de son rôle de cofacteur de réactions enzymatiques, il permet, chez certaines espèces, de mieux tolérer l'oxygène (élimination de l'ion super oxyde) (De Man, 1961).

Selon (Morin *et al.*, 1994), la présence de fer n'est pas indispensable chez les bactéries lactiques. Cependant, il a été observé que le fer stimule la croissance de *Lactobacillus johsonii*, lorsque les sources de nucléotides sont limitées (Elli *et al.*, 2000). Ceci suggère un rôle du fer dans la synthèse des purines et pyrimidines.

Chez les micro-organismes aérobies, le fer est indispensable, puisqu'il est inclus dans les cytochromes composant la chaîne respiratoire. Il a été démontré que certaines bactéries lactiques avaient une chaîne de transport d'électrons active, lorsque le milieu contient une source de noyau hème (Duwat *et al.*, 2001). Cette propriété peut être utilisée pour améliorer la croissance et la survie des lactocoques. Le calcium a été décrit comme non essentiel, stimulant, ou essentiel, selon les bactéries lactiques étudiées (Boyaval, 1989).

I.5.2. Enzymes et métabolismes

Les bactéries lactiques sont équipées d'un grand nombre d'enzymes qu'on peut classer selon leur localisation, leur type de réaction et le substrat qu'elles dégradent : lactase, citratase, protéinases, peptidases, qui fractionnent respectivement le lactose, les citrates, les protéines et les peptides.

Les facteurs qui agissent sur la vitesse du métabolisme sont le pH et la température notamment (Deroissart, 1986).

I.5.2. 1. Le pH

La cinétique des réactions enzymatiques et par conséquent du métabolisme est fortement influencée par le pH. Chaque enzyme présente un pH optimum d'action au-dessus

et en dessous duquel son activité diminue. Cet effet du pH constitue un des éléments régulateurs du métabolisme cellulaire (Adamberg *et al.*, 2003).

Toutes les bactéries du groupe lactique homofermentaire ont un pH optimal d'action situé entre 5,5 et 6,5 (pour les *Lactobacillus* et les *Streptococcus* respectivement) et un pH minimal d'action de 3,5 et 4,5 (pour les *Lactobacillus* et les *Streptococcus* respectivement) (Adamberg *et al.*, 2003). Le tableau I résume les valeurs de pH limites de la croissance de certaines bactéries lactiques.

Tableau I : pH limites de quelques bactéries lactiques, le pH limite de croissance des bactéries lactiques (Mescle et Zucca, 1988) est le suivant :

Bactéries lactiques	pH minimum	pH optimum	pH maximum
En général	3,2	5,5-6,5	10,5
<i>S.lactis</i>	4,1-4,8	6,4	9,2
<i>Lb.acidophilus</i>	4,0-4,6	5,5-6,0	7,0
<i>Lb.plantarum</i>	3,5	5,5-6,5	8,0

I.5.2.2. La température

La vitesse de la réaction enzymatique est en fonction de la température.

Selon (Deroissart, 1986), chez la plus part bactéries lactiques utilisées dans l'industrie laitière, les températures extrêmes d'activité sont de 5 à 55 °C et les températures optimum d'activités sont comprises entre 18°C et 46°C selon l'espèce bactérienne considérée.

I.5.3. Effet de L'oxygène

A quelques exceptions près, les bactéries lactiques sont incapables de respirer. Elles produisent de l'énergie à partir des sucres selon la voie homo fermentaire ou hétéro fermentaire (Duwat *et al.*, 2001).

Cependant, la tolérance des bactéries lactiques à l'oxygène est variable. En fonction des souches et des conditions de cultures, l'oxygène peut exercer, soit un effet stimulant, soit un effet inhibiteur. Les souches de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* sont moins résistantes à l'oxygène que *Streptococcus thermophilus* et les lactocoques.

I.6. Les principaux rôles des bactéries lactiques en panification

Le rôle protéolytique des bactéries lactiques : La dégradation des protéines est due, soit à l'activité protéolytique bactérienne, soit à l'activation des protéases de la farine en milieu acide. Les bactéries lactiques provoquent une augmentation des protéines solubles dans la pâte et l'apparition de peptides et d'acides aminés qui outre le fait qu'ils stimulent la croissance des microorganismes, interviennent dans la formation de certains composés aromatiques (De Vuyst *et al.*, 2002).

- **La production du gaz carbonique :** Les levures jouent un rôle important dans la production du gaz carbonique provenant de la dégradation des glucides qui contribue à la levée de la pâte (Onno et Roussel, 1994). Les bactéries lactiques hétéro fermentaires produisent du gaz carbonique mais comparativement aux quantités produites par les levures, elles contribuent faiblement à la levée de la pâte (Onno et Roussel, 1994). Il a été noté que l'association du *Lb. sanfranciscensis* avec *S. cerevisiae* et *S. exiguus* M14 accroissait la production du gaz carbonique en comparaison avec *S. cerevisiae* seule (Gobbetti *et al.*, 1997).
- **L'activité antimicrobienne :** Les bactéries lactiques ont un rôle fondamental dans l'inhibition des flores non lactiques, dont certaines sont préjudiciables à la qualité du pain. Cette action est due à l'abaissement du pH (qui inhibe la croissance de la plupart des germes non lactiques), à la toxicité propre de l'acide lactique, mais aussi à la sécrétion de bactériocines (facteurs bactéricides) et des substances antifongiques (Desmazeaud, 1998).
- **L'activité antifongique:** Des substances comme l'acide phényllactique et l'acide 4-hydroxy-phényllactique isolées des souches de *Lb. plantarum* 21B et 20B ont montré une activité inhibitrice contre *Aspergillus*, *Penicillium* et *Monilia*. (Gobbetti *et al.*, 2005, Lavermicocca *et al.*, 2003).

I.7. Production des bactéries lactiques pour l'industrie agro-alimentaire

Leur première utilisation humaine pour la production de produits laitiers fermentés (fromage, yaourt, beurre) a été mise en évidence dans des textes archaïques datant de plus de 5000 ans retrouvés en Iraq (Teuber, 1993).

Les bactéries lactiques sont classiquement impliquées dans un grand nombre de fermentations alimentaires, seules ou avec d'autres micro-organismes (transformation du lait,

boissons fermentées, salaison, fermentation des végétaux), et sont également étroitement associées à l'environnement humain (**Tableau. II**). L'acide lactique, qui est le produit principal du métabolisme fermentaire, joue un rôle majeur dans la conservation des aliments puisqu'il inhibe fortement la croissance des bactéries pathogènes à bas pH (Stiles, 1996). Il a également un rôle direct dans l'industrie laitière puisqu'il permet la formation du caillé à bas pH. Les bactéries lactiques participent également à la texture (production d'exopolysaccharides) et à la saveur des produits laitiers (Stiles, 1996).

Tableau .II: Utilisations des bactéries lactiques dans la production alimentaire (d'après McKay et Baldwin, 1990)

Applications	Espèces utilisées
Fermentations de végétaux	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>
Fermentations de viandes et poissons	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
Boissons alcoolisées	<i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Café et cacao	Bactéries lactiques variées
Sauce de soja	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Pediococcus soyae</i>
Aliments fermentés indigènes	Bactéries lactiques variées
Ensilage	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Probiotiques	<i>Lactococcus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i>
Pain au levain	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>
Biscuits	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Leichmannii</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus brevis</i>
Produits laitiers fermentés	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. Lactis biovar diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides ssp. Cremoris</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> . <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> .

De nos jours, les bactéries lactiques font l'objet de recherches intensives qui sont

Améliorées par la disponibilité de la séquence complète du génome de nombreuses bactéries lactiques : *Lactococcus lactis* IL1403 (Bolotin *et al.*, 2001), *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (Kleerebezemé *et al.*, 2003), *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (Pridmore *et al.*, 2004). *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Altermann *et al.*, 2005). La production sans cesse en augmentation de produits laitiers fermentés et surtout de fromage, 18 millions de tonnes en 2004 alors que seulement 15 millions de tonnes étaient produites en 1999, conduit aujourd'hui à une rationalisation indispensable de l'utilisation des ferments lactiques dans l'industrie. Les technologies laitières constituent le secteur principal d'application des bactéries lactiques. La compréhension de la physiologie de ces microorganismes contribue ainsi à un meilleur contrôle des procédés de même qu'à l'amélioration et à la diversification des qualités organoleptiques et texturales des produits laitiers fermentés.

Pour cela diverses stratégies ont été mises en place, il s'agit tout d'abord d'une meilleure sélection des souches et leur utilisation en mélanges complexes dans des levains de culture. Une optimisation métabolique des souches a également été envisagée afin d'augmenter la production d'arômes (Ferain *et al.*, 1996, Holset *et al.*, 1999, Hugenholtz *et al.*, 2000), de polysaccharides, de vitamines ou encore de la protéolyse des protéines du lait.

Les bactéries lactiques sont également impliquées dans de nouveaux types de produits en tant que « probiotiques ». Il s'agit de micro-organismes vivants qui une fois ingérés, vont conférer un effet physiologique bénéfique à leur hôte animal grâce à leurs propriétés microbiennes (Fuller, 1992). Les genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus* abritent des espèces considérées comme probiotiques (Fuller, 1991 ; Gordin et Gorbach, 1992). D'autres bactéries, qui ne colonisent pas naturellement le tractus digestif des mammifères, mais sont utilisées comme starters dans l'industrie laitière sont également considérées comme des probiotiques, *Lb. bulgaricus* et *St. thermophilus*.

Chapitre II

II. Généralités sur le Stress

II.1. Comment étudier un stress ?

La notion de stress intervient à partir de que les conditions optimales de croissance d'un microorganisme ne sont pas réunies. Par conséquent, quelle que soit sa nature, toute modification environnementale conduisant à des conditions de croissance non favorables va perturber la physiologie cellulaire et sera donc perçue comme un stress. La capacité d'adaptation des microorganismes aux différentes conditions de vie qu'ils rencontrent va être déterminante pour leur survie et leur développement (Alexander *et al.*, 2008)

II.2. Définition

Le stress acide est un stress important pour les bactéries lactiques puisqu'elles acidifient leur milieu au cours de la croissance et correspond à toute modification dans le génome, le protéome ou dans l'environnement qui provoque une croissance réduite ou effectue la capacité à survivre de telles modifications conduisent la cellule à tenter de restaurer un profil métabolique qui serait favorable à la survie ou bien à une croissance plus rapide. (Booth, 2002).

Dans ce chapitre, nous verrons la modalité d'applications du stress puis nous ferons les effets de ce dernier sur les bactéries lactiques.

II.3. Modalité d'application du stress

Les études publiées abordant la notion de stress selon deux modalités d'application possibles : application prolongée d'une contrainte modeste ou application brutale d'un stress létal (Kempf et Bremer, 1998 ; Piuri *et al.*, 2003).

II.3.1. Stress prolongé

Cette modalité d'application du stress consiste à inoculer les bactéries dans un milieu modérément hostile, c'est-à-dire permettant une croissance. Il s'agit ici de suivre l'adaptation progressive (ou acclimatation) de la bactérie face à un stress prolongé (Kempf et Bremer, 1998). L'évaluation de l'impact du stress prolongé sur la croissance est classiquement réalisée par turbidimétrie en mesurant les effets des variations des paramètres de croissance. Il peut s'agir de l'augmentation du temps de latence ou de la diminution du taux de croissance et de l'absorbance finale (Baliarda, 2003).

Différentes approches protéomique ont montré que l'acclimatation au stress s'accompagne de profondes modifications du métabolisme cellulaire (Marceau *et al.*, 2003, Parasad *et al.*, 2003).

II.3.2. Stress de type choc

Le stress peut également prendre la forme d'une contrainte intense et de courte durée (chocs) (Piuri *et al.*, 2003). La réponse de la bactérie sera évaluée en termes de survie après que la contrainte ait été supprimée, et ceci est principalement par numération sur milieu gélosé. Plusieurs facteurs influencent le taux de survie d'une population bactérienne après un stress de type choc : l'état physiologique des cellules, le genre, l'espèce et parfois même la souche considérée (Kim *et al.*, 1999).

Selon Kim (2002). Les cellules d'une même culture bactérienne ne sont pas toutes exactement dans le même état physiologique. Chacune possède un contenu protéique donné et présente, par conséquent, elles ont un niveau de résistance au stress létal différent (Poolman *et al.*, 2004). Ainsi, les cellules d'une même population de *Lc. Lactis* ayant survécu à un stress intense (99,99% mortalité) sont toutes capables de croître ultérieurement en absence de stress tandis que seule une proportion peut survivre à un stress intense ultérieur (Kim *et al.*, 2002). Les cellules survivant au premier stress ne possédaient donc pas toutes le même équipement de réponse au stress.

III. Effet de stress acide sur les bactéries

Les bactéries lactiques produisent au cours de la croissance de l'acide lactique qui inhibe pour une partie le développement de la flore indésirable dans les produits fermentés (Shelef, 1994). L'acide lactique est un acide faible dont le pKa est de 3,86. Il existe sous deux formes : la forme non dissociée $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ (acide lactique) et la forme dissociée $\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^-$ (lactate). L'équilibre entre les deux formes dépend du pH de la solution: plus le pH est bas, plus la forme non dissociée est représentée. Sous sa forme non dissociée, l'acide lactique peut diffuser à travers la membrane (Corrieu et Luquet, 2008).

Chez les microorganismes, l'effet d'un stress acide peut affecter différents niveaux de la morphologie, la croissance et la survie des cellules.

III.1. Effet sur la morphologie

L'enveloppe cellulaire constitue l'interface entre l'environnement et le milieu intracellulaire. Elle est le siège des transports et est la plus exposée aux stress extracellulaires. Il n'est donc pas étonnant qu'elle joue un rôle majeur dans l'adaptation aux changements environnementaux. Chez plusieurs espèces de BL, L'acquisition de la tolérance au stress acide nécessite aussi des modifications au niveau de la membrane cytoplasmique. On a ainsi observé des changements au niveau de la composition en acide gras de la membrane. Chez *Oenococcus oeni*, l'adaptation à pH acide s'accompagne d'une cyclisation des acides gras insaturés (Drici-Cachon *et al.*, 1996a).

III.2. Effet sur la croissance

Les effets du stress dépendent des modalités d'application de ce dernier, Ils entraînent surtout des défauts lors de la croissance bactérienne. La diminution du pH qui peut atteindre 3,5 à 4,5 est souvent responsable de l'arrêt de la croissance et par conséquent d'augmenter la fraction d'acide lactique sous forme non dissociée qui peut alors diffuser librement à travers la membrane et s'accumule dans la cellule (Corrieu et Luquet, 2008).

Les conséquences délétères de l'accumulation des protons dans le cytoplasme sont d'ordre énergétique, enzymatique et structural (Corrieu et Luquet, 2008).

- Sur le plan énergétique, le transport de molécules à travers la membrane est altérée en raison des perturbations de la force proton motrice.
- Sur les activités enzymatiques ne sont réduites voire nulles selon la valeur de pH_i atteinte. Le stress acide peut entraîner la dénaturation et l'agrégation des protéines de la cellule.

Les répercussions de l'oxygène sur la physiologie cellulaire sont multiples. D'une part, la présence d'oxygène peut entraîner des inhibitions d'enzymes, un arrêt de croissance, des remaniements métaboliques importants. D'autre part, l'oxygène peut permettre la croissance sur certaines sources carbonées comme l'acide lactique.

L'analyse de la réponse adaptative au stress acide a mis en évidence la surexpression des protéines universelles « chaperons moléculaires » comme **GroEL** et **DnaK**.

- Sur des altérations de l'ADN sont également observées. L'acidification du cytoplasme génère des événements de dépurination et de dépyrimidation de l'ADN qui ont

pour conséquence d'induire les systèmes de réparation de l'ADN (Hartke *et al.*, 1996 ; Quivery *et al.*, 1995).

III.3. Sur la survie

Les bactéries lactiques ne survivent pas à une acidification brutale du milieu. Par contre, cette survie peut être augmentée par une phase d'adaptation à des pH intermédiaires (Rallu, 1999)

La capacité de survie à l'acidité gastrique varie beaucoup selon genres et souches. Plusieurs hypothèses peuvent être faites pour expliquer ces différences. Certains auteurs incriminent des différences de résistance de la paroi cellulaire (Chou, 1999 et Conway, 1987 et Rallu, 1999).

Chou et Weimer ont montré des différences dans la composition en acides gras de la Paroi cellulaire d'une souche de *Lb. Acidophilus* et de son variant résistant à l'acidité. Cette différence portait essentiellement sur l'acide gras C14:1, présent chez la souche Sauvage mais absent chez le variant résistant à l'acidité (Chou et Weimer, 1999).

Rallu (1999). A également démontré que la résistance à l'acidité de mutants de *L. lactis* impliquait des gènes de biosynthèse de la paroi tel que le gène *pbp2B*. Ce gène code en effet pour une Enzyme impliquée dans la synthèse du peptidoglycane ; elle possède à la fois une activité transglycolase pour polymériser le brin de glycane et une activité transpeptidase pour lier entre eux les brins par leur chaîne peptidique. Le maintien de l'intégrité de la Paroi semble donc être un point important dans la résistance à l'acidité puisque la paroi constitue pour la bactérie la première barrière contre les agressions extérieures.

Chapitre III

IV. La réponse au stress

Au cours de son existence, tout organisme vivant est amené à faire face aux fluctuations de son environnement. Dans ce contexte, les bactéries sont connues pour leur facilité de réaction aux variations du milieu qui les entoure, en mettant rapidement en place des mécanismes d'adaptation et de défense. Les premières études sur la réponse d'un organisme vivant à une variation d'un paramètre environnemental ont concerné la bactérie exposée à une élévation de température (Dridier et Prévost, 2009). Ce choc thermique a permis d'établir les principales caractéristiques d'une réponse à un stress, à savoir l'acquisition d'une résistance transitoire et le changement d'expression du programme génétique. Depuis, ces études se sont étendues à plusieurs organismes vivants dont les bactéries et à de nombreux stress tels que les variations de pH, de pression osmotique, le choc oxydatif, la carence en nutriment(Dridier et Prévost, 2009).

En effet, ces trois dernières décennies ont vu les recherches en microbiologie s'orienter vers l'étude des réponses des bactéries aux fluctuations des paramètres physico-chimiques de leurs environnements. Ainsi, un stress modéré entraîne un ralentissement de la croissance, tandis qu'un stress létal induit un infléchissement brutal de la survie. Des bactéries cultivées dans des conditions sublétales (stress modéré)peuvent acquérir une résistance aux effets normalement létaux d'un stress. Cette période dite d'adaptation, qui peut être homologue pour un prétraitement de même nature que l'épreuve ou hétérologue (protection croisée) pour un stress de nature différente, déclenche des mécanismes susceptibles de protéger les cellules de façon transitoire des dégâts occasionnés par des doses plus délétères (dose d'épreuve). Cette augmentation transitoire de la résistance est un phénomène inductible appelé tolérance. Globalement, quand une bactérie confrontée à des conditions hostiles de son environnement, elle y répond en mettant en place un réseau de régulationsophistiqué caractérisé par l'induction des protéines de stress. Celles-ci sont le plus souvent multifonctionnelles et ubiquitaires. Cependant, leur analyse peut les répartir en deux groupes : les protéines générales de stress(GSP) et des protéines spécifiques d'un stress donné (SSP)(Dridier et Prévost, 2009).

IV.1.Modalités de réponse à quelques stress unitaires

Dans ce chapitre, nous verrons comment les bactéries lactiques répondent à diverses agressions rencontrées lors des procédés industriels qui les utilisent (températures élevées ou baisse, stress acide, osmotique ou oxydatif)(Dridier et Prévost, 2009).

Cet état des lieux de **la réponse adaptative des bactéries lactiques** aux contraintes environnementales :

- ✓ Contrainte thermique
- ✓ Contrainte acido-basique
- ✓ Contrainte osmotique
- ✓ Contrainte oxydative

IV.1.1. Contrainte thermique

IV.1.1.1. le stress thermique chaud

Chez les bactéries lactiques, la réponse au choc thermique chaud a d'abord été étudiée en analysant ses effets sur la croissance et la résistance à la chaleur par l'estimation de la survie des cellules consécutivement à l'épreuve. Ainsi, à l'instar des autres bactéries Gram positives, les bactéries lactiques répondent à une élévation de la température en développant un état de thermo tolérance qui peut dépendre de nombreux facteurs dont notamment l'âge des cellules et l'écart entre la température optimale et celle de l'épreuve. Cette thermotolérance est d'autant plus prononcée ou plus rapidement acquise quand les cellules ont préalablement été soumises à une température subi-optimale (ou à un stress hétérologue) avant l'épreuve. Ces aspects ont été observés pour plusieurs espèces de bactéries lactiques telles que *L.lactis*, *Lb. Bulgaricus*, *Lb. Acidophilus*, *Lb.casei*, *Lb. Helveticus*, *Lb. Collinoides*, *Le. Mesenteroides*, *O.oeni*, *Ent.faecalis*, et pour les *Actinobacteria* apparentées *Propionibacterium freudenreichii* et différentes espèces de *Bifidobacterium* (Drider et Prévost, 2009). Expérimentalement, l'état de thermotolérance s'établit rapidement (de l'ordre de quelques minutes). Il est directement lié à l'induction de protéines de choc thermique (HSPs). Une élévation de température de 10°C par rapport à l'optimum de croissance est largement suffisante pour induire ces HSPs. Ainsi, l'analyse différentielle par électrophorèse bidimensionnelle des profils protéiques suite à un stress thermique chaud a révélé la surexpression de 34 HSPs chez *Ent. Faecalis*, 17 chez *L. lactis*, 20 chez *Lb. Bulgaricus*, 31 chez *Lb.plantarum*, 13 chez *B. longum*, 37 chez *Strep. Thermophilus*, et 66 chez *P. freudenreichii*. (Drider et Prévost, 2009).

IV.1.1.2. Adaptation au froid chez les bactéries lactiques

IV.1.1.2.1. Effet du froid sur la croissance des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont généralement décrites comme des microorganismes mésophiles, avec une température optimale de croissance de 30°C (van de Guchte *et al.*, 2002). Leur température maximale de croissance se situe entre 35 et 45°C, et leur température minimale de croissance peut se situer aux alentours de 0°C, en fonction du caractère psychrotrophe ou non de la souche. Un seul exemple de bactérie lactique ne présentant pas de croissance à 30°C a été décrit dans la littérature : il s'agit de *Lactobacillus algidus*, une espèce décrite par Kato *et al.* (2000), isolée de bœuf réfrigéré emballé sous vide.

Les bactéries lactiques sont d'une grande importance dans le domaine de l'agroalimentaire. Les différentes étapes de procès auxquelles elles sont soumises, ainsi que les impératifs de conservation les exposent souvent à des températures sub-optimales de croissance, voire même des températures potentiellement létales (congélation). Il est donc très important de pouvoir prévoir le comportement de ces bactéries dans les situations de stress froid, aussi bien au niveau de la survie que de la croissance. Cependant il a été observé que la résistance au froid variait fortement en fonction des espèces (van de Guchte *et al.*, 2002).

L'étude de l'adaptation au froid des bactéries lactiques est récente, et s'est principalement concentrée sur des espèces modèles telles que *Lc. lactis*. Lorsque des cellules de bactéries lactiques en phase exponentielle de croissance sont exposées à une température sub-optimale (20°C sous la température optimale de croissance), elles continuent de se multiplier, mais à une vitesse plus réduite. Chez *E. coli*, après un passage de 37 à 10°C, une période de latence de 4 h est observée pendant laquelle aucune croissance n'a lieu suivie par une reprise de la croissance à un rythme beaucoup plus réduit (temps de génération de 24 h) (Jones *et al.*, 1987). Chez *Lc. lactis*, un passage de 30 à 20°C n'entraîne pas de latence. A 10°C une période de latence de 6 h est observée, suivie par une reprise de la croissance à une vitesse plus faible (Wouters *et al.*, 1999a). Chez *Sc. thermophilus*, la période de latence suivant un choc de 42°C(40°C) à 20°C est de 1 à 2 h (Wouters *et al.*, 1999b). Comme on peut le constater, ce mécanisme est donc grandement variable selon les espèces.

IV.1.1.2.2. Les protéines induites par le froid

L'utilisation de l'électrophorèse bidimensionnelle a permis d'observer les effets d'un choc froid sur le protéome des bactéries lactiques. La production de protéines induites par le froid ou CIP (cold-induced proteins) a été constatée chez *Lc. lactis* (Wouters *et al.*, 1999a), *Sc. thermophilus* (Wouters *et al.*, 1999b) et *Lb. sakei* (Marceau *et al.*, 2004) respectivement 22,

23, 14 protéines ont été dénombrées. L'identification de plusieurs de ces protéines suggère une implication dans de nombreux aspects du métabolisme tels que le catabolisme des sucres (Hpr, CcpA, β -phosphoglucomutase, G3DPH), la structure du chromosome (homologue de HslA), la signalisation intra-cellulaire (LlrC) et l'adaptation générale au stress (OsmC, MsrA, Ohr, Usp) (Wouters *et al.*, 2000 ; Marceau *et al.*, 2004). Comme chez *E. coli* ou *B. subtilis*, des protéines de choc froid de la famille des CSP ont été détectées parmi les CIP chez les bactéries lactiques. Le nombre de gènes codant pour des CSP varie fortement selon les espèces et les genres (Champomier-Verges *et al.*, 2002).

IV.1.2. Contrainte acide

L'exposition des bactéries lactiques à un stress acide modéré améliore fortement leur résistance vis-à-vis d'une contrainte acide létale, cette réponse est appelée Acide Tolérance Réponse (ATR). Cette réponse a été décrite chez de nombreuses bactéries lactiques, telle que *L. lactis*, *Ent. faecalis*, ou encore de nombreux lactobacilles. Dans tous les cas, le développement de l'ATR s'accompagne de l'induction de nombreuses protéines. Ainsi, chez *L. lactis*, une analyse protéomique révèle la dérégulation positive de plus de 20% des protéines visualisées par électrophorèse bidimensionnelle. L'indentification de ces protéines (acide stress proteins, ASP) fournit des renseignements précieux pour la compréhension des mécanismes d'adaptation. Nous traiterons ici des systèmes mis en évidence chez les bactéries lactiques, pour lesquels le lien avec l'adaptation à l'acidité est le mieux compris à ce jour. Il s'agit en particulier des mécanismes visant à réduire les effets de l'accumulation intracellulaire de protons, en les expulsant du milieu intracellulaire, en le neutralisant (par formation d'espèces basiques), ou réparant les dégâts occasionnés (Drider et Prévost, 2009). L'expulsion des protons est majoritairement assurée par la F₀F₁-ATPase (Fig.1A). Ce système multimérique est surtout connu pour son rôle dans la production d'ATP dans le métabolisme respiratoire de nombreuses bactéries, mais peut également catalyser la réaction inverse. La capacité de croître et de survivre en milieu acide apparaît clairement corrélée à cette activité chez les bactéries lactiques. En effet chez ces bactéries, l'activité F₀F₁-ATPase augmente en milieu acide et est essentielle dans ces conditions (Drider et Prévost, 2009). En outre des mutants affectés au niveau de ce système montrent un défaut de croissance à bas pH chez des lactocoques, des entérocoques, des lactobacilles ou encore chez *O. oeni*. Réciproquement, chez cette dernière espèce, un mutant montrant une activité F₀F₁-ATPase augmentée est particulièrement tolérant à l'acidité. L'un des principaux systèmes participant à la neutralisation du milieu intracellulaire en situation de stress acide est le

système Arginine Déiminase (ADI). Ce système est constitué de 5 partenaires, dont les gènes sont généralement organisés en un opéron. Dans cette voie métabolique (Fig.1B), l'arginine déiminase (codée par le gène *arcA*) convertit l'arginine en ammoniac et citrulline, qui est elle-même transformée en ornithine et carbamoyl phosphate par une ornithinecarbamoyl transférase (*ArcB*). L'ornithine est alors excrétée par système antiport arginine/ornithine généralement associé à ce système (*ArcD*), tandis que le carbamoyl phosphate est dissocié en ammoniac et CO₂ par une carbamate kinase (*ArcC*), généralement ainsi 1 mole d'ATP par mole d'arginine dégradée. Les gènes codant cette voie sont présents dans de nombreuses bactéries lactiques. L'induction de ces gènes en situation de stress acide et leur rôle essentiel dans ces conditions ont été montrés chez *L.lactis*. La neutralisation du milieu intracellulaire peut également provenir de la décarboxylation d'acides organiques. Le système le mieux caractérisé est le système glutamate décarboxylase (*Gad*) de *L.lactis* qui catalyse la transformation du glutamate en γ -aminobutyrate (Fig.1C). Ce produit de dégradation est expulsé dans l'environnement par un système antiport γ -aminobutyrate/glutamate (Drider et Prévost, 2009).

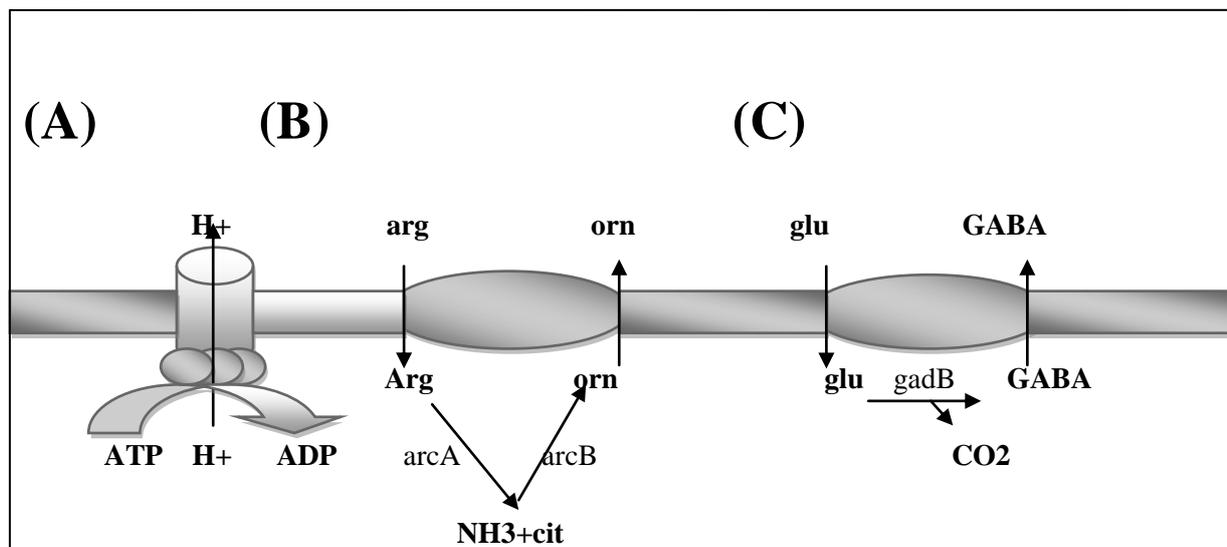


Figure1: Stratégies d'adaptation des bactéries lactiques vis-à-vis du stress acide utilisant la F0F1-ATPase (A), le système arginine déiminase (B) et le système glutamate décarboxylase (C). Abréviations : *arg*, arginine ; *orn*, ornithine ; *cit*, citrulline ; *glu*, glutamate ; *GABA*, *gamma amino butyrate* (Drider et Prévost, 2009).

IV.1.3. Contrainte osmotique

L'abaissement de l'activité de l'eau extérieure provoque un stress osmotique chez la flore microbienne des aliments qui se matérialise par une diminution de la pression de

turgescence pouvant conduire à la plasmolyse cellulaire et une dénaturation des macromolécules causée par l'augmentation de la force ionique. La réponse des bactéries au stress hyper-osmotique consiste principalement à accumuler des composés dits compatibles (par synthèse ou transport) dans leur cytoplasme afin de rétablir une pression de turgescence compatible avec les fonctions cellulaires (voir revue Sleator et Hill, 2002).

IV.1.4. Contrainte oxydative

Le stress oxydatif se définit comme un déséquilibre de la balance des molécules oxydantes et antioxydants en faveur des premières nommées. Si l'oxygène moléculaire est plutôt stable, sa réduction univalente, due aux activités métaboliques, conduit à la formation de composés hautement réactifs appelés intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROI ou ROS pour réactive oxygène species), néfastes pour la cellule bactérienne. En effet, ces molécules interagissent directement avec des composés cellulaires tels que l'ADN, les protéines ou les lipides membranaires, entraînant ainsi un arrêt de la croissance ou même la mort de la cellule (Drider et Prévost, 2009).

L'augmentation du taux de radicaux libres dans la cellule est le fruit de réductions successives de l'oxygène moléculaire (O_2) aboutissant à la formation d'une molécule d'eau (Fig.2). Par transfert d'un électron, l'oxygène est d'abord réduit en anion superoxyde (O_2^-) lui-même réduit pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), à son tour réduit en radical hydroxyl (OH^\cdot) (Drider et Prévost, 2009).

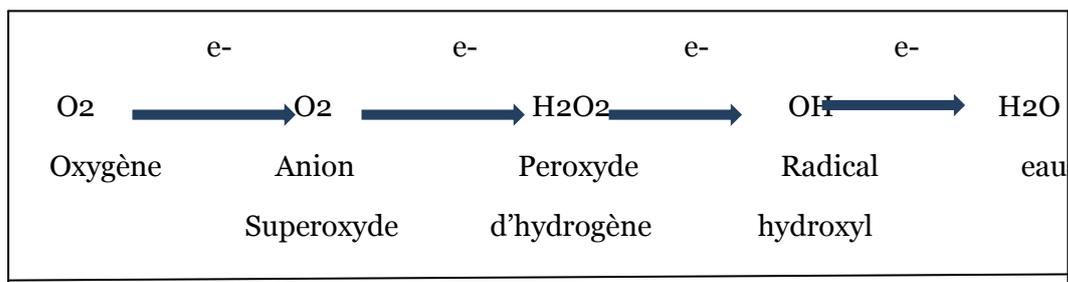


Figure 2 : Etapes de réduction de l'oxygène moléculaire en eau (Drider et Prévost, 2009).

IV.2. Les régulateurs globaux de la réponse aux stress

Quatre mécanismes de régulation contrôlent l'expression de plus de deux cents gènes de stress. Trois de ces mécanismes ont été caractérisés, ils impliquent le facteur sigma B (δB) et les répresseurs transrationnels HrcA et CtsR (Alexandre, 2008). Les facteurs sigma sont des sous-unités protéiques de l'ARN polymérase qui interviennent lors de l'initiation de la

transcription. Ils participent au positionnement de l'ARN polymérase sur la molécule d'ADN en reconnaissant des sites spécifiques, appelés promoteur, situés en amont du gène à transcrire. Les promoteurs sont caractérisés par deux séquences spécifiques conservées appelées séquences -10 et -35. Le facteur sigma δA de *B. subtilis* permet l'expression de la plupart des protéines constitutives de la bactérie en conditions optimales de croissance (Alexandre, 2008).

La plupart des bactéries possèdent plusieurs facteurs sigma différents qui vont diriger l'holoenzyme sur des promoteurs distincts possédant des séquences consensus différentes. Ceci va permettre la transcription de certains gènes impliqués de façon spécifique en fonction des stimuli de l'environnement. Ainsi, le facteur alternatif δB permet de réguler l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse au stress thermique chez *B. Subtilis*. Il constitue le régulateur central de la réponse au stress chez de nombreuses bactéries à Gram positif telles que les bactéries des genres *Bacillus*, *Staphylococcus* et *Listeria*. Néanmoins, parmi les autres bactéries à Gram positif à faible pourcentage en GC, principalement les bactéries lactiques et les bactéries du genre *Clostridia*, aucun facteur sigma de type δB n'a été caractérisé (Alexandre, 2008).

Le facteur δB régule l'expression des gènes de stress dits de classe II tandis que les gènes de stress dont l'expression est contrôlée par les régulateurs HrcA et CtsR appartiennent. Respectivement à la classe I et III, leur transcription requérant le facteur δA . L'induction de l'expression de ces gènes en condition de stress implique un mécanisme de dérépression de la régulation HrcA et/ou CtsR dépendante. La répression transcriptionnelle par HrcA et CtsR se fait par la reconnaissance par ces régulateurs de motifs caractéristiques appelés sites opérateurs localisés dans la région promotrice des gènes (Alexandre, 2008). HrcA se fixe spécifiquement à un motif inversé répété (TTAGCACTCN⁹GAGTGCTAA) appelé CIRCE (Controlling inverted Repeat of chaperone Expression) tandis que CtsR reconnaît une séquence répétée directe (GTAAANANAGTCAAA) appelée boîte CtsR. La fixation de HrcA et CtsR sur leur site respectif empêche la transcription par l'ARN polymérase de gène de stress en conditions optimales de croissance. Chez *B. subtilis* comme chez la bactérie lactique *L. lactis*, l'expression des opérons groESL et dnaK est sous le contrôle du régulateur HrcA tandis que la régulation de l'expression des gènes clp dépend du régulateur CtsR. Cependant, contrairement à *B. subtilis*, l'opéron groESL de *L. lactis* est soumis à une double régulation HrcA /CtsR-dépendante. Ce chevauchement des régulateurs HrcA et CtsR, c'est-à-dire des gènes régulés par HrcA et CtsR, est commun aux bactéries de la famille des

Streptococcaceae(*S.pneumoniae*,*S. pyogènes*,*S.mutans*,*S.agalactiae* et *L .lactis*) (Alexandre, 2008).

L'état actuel des connaissances relatif à la régulation des gènes de stress est moindre pour les bactéries lactiques du vin. Néanmoins, le séquençage génomique a permis d'identifier des gènes codant des protéines similaires aux répresseurs HrcAetCtsR chez *Lb. Plantarum*, *Lb. Casie* et *Lb .brevis*. Comme cela a été décrite chez *L lactis*, la régulation de l'expression des opérons gro ESL et dnaK de *Lb. plantarun* est placé sous la dépendance du régulateur HrcA. L'analyse de la région promotrice des gènes hsp18.5 et hsp19.3 de *Lb. plantarum* a permis d'identifier une séquence CIRCE suggérant une régulation HrcA dépendante de ces gènes. De plus, une séquence nucléotidique similaire à la séquence reconnue par le régulateur CtsR a été localisée en amont du gène hsp18.5.L'expression de ce gène dépendrait donc des deux répresseurs HrcA et CtsR(Alexandre, 2008). Bien qu'aucun facteur sigma alternatif de type δB n'ait été identifié dans le génome de *Lb.plantarum*, l'analyse de la région promotrice du gène hsp18.55 suggère une régulation δ -B dépendante de ce gène. (Alexandre, 2008).

Chez *Oeni*, seul un gène codant le répresseur CtsR a été identifié, tandis que chez *Ln .mesenteroides*, seul un gène orthologue à HrcA a été défini au sein du génome. Très peu de données sont actuellement disponibles sur la régulation de la réponse au stress chez *Ln.mesenteroides*. Seule l'induction de la synthèse des protéines chaperons GroEL et DnaK en condition de stress a été abordée jusqu'à présent(Alexandre, 2008).L'analyse du génome de *Ln.mesenteroides* ATCC8293 permet cependant de présumer une régulation HrcAdépendante des opérons groESLdnaK. Des travaux récents s'intéressant à la régulation de la réponse au stress chez *O.oeni* ont montré que CtsR constituait le régulateur central des gènes de stress chez cette bactérie. En effet, ce régulateur intervient dans le contrôle de l'expression des opérons groESL et dnaK ainsi que des gènes clpP,clpC,clp12 et hsp18.L'expression du gène clpX semble faire intervenir un autre système de régulation non caractérisé à ce jour (Alexandre, 2008).

Ainsi, les bactéries lactiques du vin semblent avoir adopté des mécanismes de régulation de la réponse au stress divers, ce qui expliquerait leur différent niveau de sensibilité et d'adaptation aux stress imposés par le milieu vin. Cette variabilité reflète la capacité que présentent les micro-organismes du vin à s'adapter à différents habitats. Ainsi en est-il de la bactérie lactique *lb. platarum* retrouvée au sien de niches écologiques très variées; boissons,

viandes et végétaux fermentés, mais aussi l'appareil digestif de l'homme. La taille particulièrement importante du génome de cette bactérie (3.3080274 Pb) peut en partie expliquer cette flexibilité d'adaptation à l'environnement. Le génome de *lb. platarum* comprend de nombreux gènes de stress codant les chaperons ubiquitaires GroESL et DnaK, les protéines ClpATpases: ClpB, ClpC, ClpE, ClpL et ClpX les protéases ClpB, HslV, FtsH et Lon ainsi que trois smHsp : Hsp18.5, Hsp18.55 et Hsp19.3 et trois protéines de choc hypothermique : CspL, CspC et CspP. L'expression de l'ensemble de ces gènes de stress est régulée par les deux répresseurs HrcA et CtsR. Cependant, d'autres mécanismes de régulation sont probablement impliqués dans la régulation de l'expression de ces gènes.

Chapitre IV

V. Le stress osmotique

V.1 Définitions

V.1.1.L'osmose

L'osmose est le phénomène de diffusion de molécules de solvant, généralement l'eau, à travers une membrane semi-perméable (Potss, 1994) qui sépare deux liquides de concentrations en soluté différentes selon la figure ci-dessous (Fig. 3). Par définition la membrane semi-perméable ne permet pas le passage de soluté. Le solvant diffuse de la solution la moins concentrée vers la solution la plus concentrée, de façon à équilibrer tant que possible la concentration de part et d'autre de la membrane et à atteindre ainsi la stabilité thermodynamique (entropie maximum) (Cavanagh *et al.*, 1996).

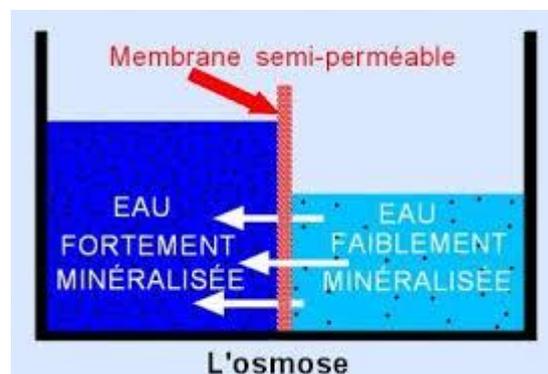


Figure 3 : phénomène d'osmose (Cavanagh *et al.*, 1996).

V.1.2.Le stress osmotique

Le stress osmotique correspond à une diminution ou une augmentation de l'osmolarité de l'environnement de la bactérie qui en modifiant la disponibilité de l'eau de la cellule affecte sa survie ou sa croissance (Csonka, 1989).

V.2.Effet de stress osmotique sur les bactéries

Les micro-organismes sont fréquemment exposés à des variations de pression osmotique du milieu environnant. La membrane cytoplasmique des bactéries est perméable à l'eau mais constitue une barrière efficace contre le passage de la plupart des solutés du milieu et des métabolites présents dans le cytoplasme. Une augmentation brusque de l'osmolarité du milieu externe entraîne un rapide flux d'eau

vers l'extérieur de la cellule, qui a pour conséquence une diminution de la pression de turgescence, le moteur de l'élongation des cellules, une variation de la concentration cytoplasmique en solutés et un changement du volume cellulaire (plasmolyse dans les cas extrêmes)(Csonka,1989). À l'inverse, un choc hypotonique provoque une entrée d'eau dans la bactérie et une augmentation du volume cytoplasmique et de la pression de turgescence. De telles variations osmotiques étant délétères pour les bactéries, celles-ci possèdent des systèmes de transport et/ou de synthèse d'osmoprotectants ou solutés compatibles qui assurent le maintien de l'homéostasie par leur accumulation dans le cytoplasme ou leur rejet selon le type de stress osmotique (Csonka, 1989).

Les solutés compatibles sont des composés organiques qui peuvent être accumulés à forte concentration dans le cytoplasme sans interférer avec les processus cellulaires, la molécule majeure étant la glycine bêtaïne(Csonka,1989). Dans leur environnement naturel, les bactéries lactiques peuvent être soumises à de forts stress osmotiques, causés par exemple par la dessiccation. Il en est de même lors de leur utilisation dans les processus de fermentation industriels, par exemple lors de la salaison des caillés au cours de la fabrication des fromages(Csonka,1989).

L'étude des mécanismes de protection contre le stress osmotique chez ces bactéries est donc d'un intérêt fondamental pour la compréhension des mécanismes de défense contre le stress osmotique chez les bactéries à Gram positif, mais aussi nécessaire pour une utilisation optimale de celles-ci dans les procédés industriels. Les données actuelles sur la réponse des bactéries lactiques au stress osmotique concernent essentiellement *L. lactis* et *L. Plantarum*, (Kempfer et Bremer,1998).

V.3.La réponse au stress osmotique

Les bactéries sont capables de vivre dans des milieux extrêmement variés car elles possèdent des systèmes de protection efficaces contre les différents stress qu'elles peuvent rencontrer. Les bactéries lactiques vivent dans des habitats où l'osmolarité est souvent élevée et varie énormément, alors que la pression osmotique intracellulaire doit rester relativement constante(Gutierrez,2001).

Lorsqu'une bactérie subit un stress osmotique, dû à une forte augmentation de la concentration en sel dans l'environnement, sa croissance est arrêtée, et des mécanismes de détresse se mettent en place pour éviter la mort cellulaire. Les

études sur la réponse au stress osmotique des bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum* et les mécanismes moléculaires sous-jacents se sont développées depuis ces dernières années, du fait de l'intérêt économique (utilisation dans l'industrie agroalimentaire) et fondamental (bactéries à Gram positif) que représentent ces organismes. La principale réponse à un choc osmotique consiste en l'accumulation dans le cytoplasme de molécules protectrices, appelées solutés compatibles, qui permettent le rétablissement de l'équilibre osmotique à l'intérieur de la bactérie. Dans cette revue, nous présenterons les connaissances actuelles sur la réponse au stress osmotique de *L. lactis* et *L. plantarum* au niveau physiologique et moléculaire (Gutierrez, 2001).

Conclusion

Conclusion

Rappelons que notre étude avait comme principaux objectifs la mise en évidence la réponse aux stress acide chez les bactéries lactique.

Le premier objectif concerne uniquement les bactéries lactiques qui interviennent pour l'industrie agro-alimentaire qui jouent un rôle majeur dans la conservation des aliments et d'autre rôle direct dans l'industrie laitière.

Ensuite nous avons parlé de l'effet du stress acide sur les bactéries lactiques:

- La diminution du pH responsable de l'arrêt de la croissance
- Aussi des modifications au niveau de la membrane cytoplasmique précisément des changements de la composition en acide gras de la membrane.
- Et ainsi la bactérie lactique ne survient pas à une acidification brutale. Mais capable de développer des mécanismes de résistance générale aux stress leur conférant une multi tolérance vis-à-vis des contraintes environnementales.

Nous avons décrit différents mécanismes de régulation souvent présentés comme des facteurs prépondérants dans la modulation de la transcription du gène, nous avons mentionné que certains gènes étaient contrôlés par plus d'un régulateur.

Bibliographie

Adamberg K, Kask S, Laht TM, Paalme T. (2003). The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *International Journal of Food Microbiology*.171-183.

Alexander H, Grandvalet C, Guilloux-Bénatier M, Romiz-Barnavon F, Tourdot-Maréchale L.(2008). Les bactéries lactiques en œnologie. Editions TEC & DOC Lavoisier. pp 62.

Altermann E, Russell WM, Azcarate-Peril MA, Barrangou R, Buck BL, McAuliffe O, Souther N, Dobson A, Duong T, Callanan M, Lick S, Hamrick A, Cano R, Klaenhammer TR. (2005). Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**: 3906-3912.

Baliarda A. (2003). Evaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*: Approches physiologiques et génétiques. Thèse de doctorat. École doctorale de sciences du vivant. Geosciences, Sciences de l'environnement.

Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarne K, Weissenbach J, Ehrlich S D, Sorokin A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res*. **11**: 731-753.

Booth IR. (2002). Stress and the signal cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *Int J Food Microbiol* **78** (1-2):19:30.

Boyaval P.(1989). Lactic acid bacteria and metal ions. *Lait*. Vol. **69**:87-113.

Cavanagh, Palmer, Rance M. (1996). Protein NMR spectroscopy - principles and Practice. edition academic press inc.

Champomier-Verges M C, Maguin E, Mistou M Y, Anglade P and Chich J F. (2002). Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *Journal of Chromatography B* **771**: 329-342.

Chou LS, Weimer B. (1999). Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **82**: 23-31.

Cocaign-Bousquet M, Garrigues C, Novak L, Lindley ND.(1995). Conditions on enzyme production. *Journal of Applied Bacteriology*. Vol. **65**: 397-404.

Cocaign-Bousquet M, Garrigues C, Novak L, Lindley ND. (1995). Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. *Journal of applied Bacteriology*. Vol.79: 108-116.

Collins MD, Samelis J, Metaxopoulos J et Wallbanks S.(2007). Taxonomic studies of some *Leuconostoc*like organisms from fermented sausages description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostocparamesenteroides* group of species J. *Appl. Bacteriol.* (75) :595-603.

Gutierrez C.(2001). *INRA, EDP Sciences*.

Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR.(1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells, *J. Dairy Sci.*70:1-12.

Corrieu G, Luquet MF.(2008). *Bactéries lactiques De la génétique aux ferments*. Editions TEC & DOC. Lavoisier. pp : 429-431.

Csonka LN.(1989). Physiology and genetic response of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.*53 :121-147.

De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. (1961). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* Vol.23:130-135.

Dellaglio F, de Roissard H, Torriani S, Curk MC et Janssens D.(1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : *Bactéries lactiques* (De Roissard H et Luquet FM). *Lorica. Uriage.* 1 : 25-116.

Deroissart HB.(1986). *Les bactéries lactiques* in lait et produits laitiers par Luquet FM Edition Technique et documentation Lavoisier Paris Tome. 3P 33.

Desmazeaud M.(1998). *Bactéries lactiques et qualité des fromages*. Laboratoire de recherches laitières. INRA.

De Vuyst L, Schrijvers V, Paramithiotis S, Hoste B, Vancanneyt M, Swings J, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E, Messens W.(2002). The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. *Applied & Environmental Microbiology.* 68.N°12: 6059-6069.

Drider Dj,Prévoste H.(2009).Bactéries Lactiques physiologie,Métabolisme,Génomique et applications industrielles.Ed.Economica.pp.127-129.

Duwat P, Sourice S, Cesselin B, Lamberet G, Vido K,Gaudu P, Le Loir Y. (2001). Respiration capacity of the fermenting bacterium *LactococcusLactis* and its positive effects on growth and survival.J.Bacteriol. Vol.**183**: 4509-4516.

Elli M, Zink R, Rytz A, RenieroR andMorelli L. (2000). Iron requirement of *Lactobacillus* spp. In completely chemically defined growth media. J ApplMicrobiol. Vol.**88** : 695-703.

Essaid I, Medini M, Hassouna M. (2009). Technological and safety proprieties of *Lactobacillus plantarum*strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. Meat Science.**81**:203-208.

Ferain T, Schanck AN, Delcour J. (1996).¹³C nuclear magnetic resonance analysis of glucose and citrate end products in aldH-LdhD double-knockout strain of *Lactobacillus plantarum*. J. Bacteriol. **178**: 7311-7315.

Fuller R. (1991).Probiotics in human medicine.Gut. **32**: 439-442.

Fuller R. (1992).History and development of probiotics.Probiotics.The scientific basis.p1-8. (Editeur: Fuller R) Chapman etHall.London.

Glaasker E, Heuberger EH, Konings WN,Poolman B. Mechanism of osmotic activation ofthe quaternary ammonium compound transporter (QacT) of Lactobacillus plantarumJ. Bacteriol. (1998).**180**:5540–5546.

Gobbetti M, Corsetti A.(1997).*Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium.Food Microbiology.**14**: 175-187.

Gobbetti M, De Angelis M, Corsetti A, Di Cagno R.(2005). Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. Trends in Food Sciences and Technology.**16**:57-69.

Gordin BR, Gorbach SL. (1992).Probiotics for humans.Probiotics.the scientific basis.pp 355-376. (Editeur: Fuller R) Chapman et Hall.Londres.

Hols P,Kleerebezem M, Schanck AN, Ferain T,Hughenoltz J,Delcour J, de Vos WM. (1999).Conversion of *Lactococcuslactis* from homolactic to homoalanine fermentationthrough metabolic engineering. Nat. Biotechnol. **17**: 588-592.

Horvath P.(2000).Evolution and diversity of pyrimidine metabolism genes in lactic acid bacteria.SCI ALIMENT.Vol. **20**:71-84.

Hugenholtz J,Kleerebezem M, Starrenburg M, Delcour J, de Vos W, Hols P. (2000).*Lactococcuslactis* as a cell factory for high-level diacetyl production. Appl. Environ.Microbiol.**66**: 4112-4114.

Jones PG, VanBogelen RA and Neidhardt FC.(1987). Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*.Journal of Bacteriology.**169**: 2092-2095.

Kandler O, Weiss N. (1986). Genus *Lactobacillus*Beijerinck 1901, 212AL. In: Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology. Williams Wilkins, Baltimore. **2**,pp: 1209-1234.

Kato Y, Sakala RM,Hayashidani H, Kiuchi A, Kaneuchi C and Ogawa M. (2000).*Lactobacillus algidus* sp. nov a psychrophilic lactic acid bacterium isolated fromvacuum-packaged refrigerated beef. International Journal of Systematic and EvolutionaryMicrobiology 50 Pt**3**: 1143-1149.

Kempf B,Bremer E. (1998).Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress response to high osmolality environment. Arch.Microbiol.**17**:319-330.

Kilstrup M, Jacobsen S, Hammer, Vogensen FK.Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL and GroES by salt stress in *Lactococcuslactis*, Appl. Environ.Microbiol.(1997). **63**:1826–1837.

Kim W S J Ren& N W Dunn .(1999). Differentiation of *Lactococcuslactis*subspieceslactis and subspicescremorisstrains by their adaptive response to stresses. FEMS MicrobiolLett.**17**(1): 57-65.

Kim WS, Park JH, Tandianus JE, Ren J & Dunn N W.(2002). A distinct physiological state of *Lactococcuslactis*cells that confers survival against a direct and prolonged exposure to severe stresses.FEMS Microbiol Lett.**212**(2): 203-8.

Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, Molenaar D,Kuipers OP, Leer R,Tarchini R, Peters SA,Sandbrink HM, Fiers M W E J , Stiekema W, Klein LankhorstRM, Bron PA, Hoffer SM,Nierop Groot MN,Kerkhoven R, de Vries M,Ursing B, de Vos WM,Siezen RJ.(2003).Complete genome sequence of*Lactobacillus plantarum* WCFS1.Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100** :1990-1995.

Konig,H et Frohlich, J.(2009).Biology of microorganisms on grapes, in must and in win. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Larpent JP.(1989).Les bactéries lactiques, Les microorganismes de fermentations. Dans Microbiologie alimentaire, Tome 2. Bourgeois. CM. Larpent. JP.Eds. Techniques et documentation Lavoisier.pp : 3-15.

Lavermicocca P, Valerio F, Visconti A.(2003). Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. Applied and Environmental Microbiology. 69. N°1: 634-640.

Leveau JY, et Bouix M.(1980).La flore lactique “ In “ Techniques d’analyse et de contrôle dans les industries Agro-Alimentaires” par Bourgeois C.M. LeveauJY.Edition technique et documentation Lavoisier. Paris. Vol .3. P331.

Leveau JY et Bouix M.(1993). Microbiologie industrielle.Les microorganismes d’intérêt industriel.Tec & Doc.Lavoisier. Paris. 85-87.

Marceau AM, ZagorecMC, Champomier-Verges MC.(2003).Positive effects of growth at suboptimal temperature and high salt concentration on long-term survival of *Lactobacillus sakei*.Res Microbiol.**154**(1): 37-45.

Marceau A, Zagorec M, Chaillou S, Mera T,Champomier-Verges MC. (2004).Evidence for involvement of at least six proteins in adaptation of *Lactobacillus sakeito* cold temperatures and addition of NaCl.Applied and Environmental Microbiology 70,7260-7268.

McKay LL, Baldwin KA.(1990). Applications for biotechnology : present and future improvements in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 87: 3-14.

Mescle JF, Zucca J.(1988). Le comportement des micro-organismes en milieu alimentaire” in microbiologie alimentaire. par Bourgeois CM,Mescle JF,Zucca J .Edition Technique et documentation Lavoisier . Paris. Tome 1 P.419.

Morin N, Bernier- Cardou M, Champagne. CP.(1994).Production of concentrated *LactococcusLactissubsp.cemoris* suspensions in calcium alginate beads. Appl.Environ. Microbiol .Vol .**58** :545-550.: 695-703.

Onno B, Roussel P. (1994). Technologie et microbiologie de la panification au levain. Bactéries lactiques Volume II. Edition Lorica. Pages 293-321.

Özer B, Kirmaci HA, Şenel E, Atmar M, & Hayaloğlu A. (2009). Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white brined cheese by microencapsulation. *International Dairy Journal*. **19**:22-29

Pilet MF, Magras C, Federighi M. (2005). Bactéries lactiques. In: bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed. Economica. Paris. 219-240. Position of lactic acid bacteria. *Biochimie*. 70. pp : 317-324.

Piuri M, Sanchez-Rivas C, Ruzal SM. (2003). Adaptation to high salt in *Lactobacillus*: role of peptides and proteolytic enzyme. *Journal of Applied Microbiology*. **95**: 372-379.

Poolman B, Spitzer JJ, Wood JM. (2004). Bactericidal roles of membrane structure and electrostatics in lipid-protein and protein-protein interaction. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1666**:88-104.

Pot B. (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc. Lavoisier. Paris. 1-106.

Potss M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev.* 58(4):755-805.
kempf B, Bremer E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Micro-biol.* (1998). **170**: 319–330.

Prasad JP, McJarrow & Gopal P. (2003). Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Appl Environ Microbiol.* **69**. (2): 917-25.

Pridmore RD, Berger B, Desiere F, Vilanova D, Barretto C, Pittet AC, Zwahlen MC, Rouvet M, Altermann., Barrangou R, Mollet B, Mercenier A, Klaenhammer T, Arigoni F, Schell MA. (2004). The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 2512-2517.

Rallu F. Étude de la résistance au stress acide de *Lactococcus lactis*. (1999). Thèse de Doctorat, Université Paris VI. France.

Rigaux P. (2008). Evaluation des propriétés immunomodulatoires de la bactérie lactique *Lactobacillus plantarum* NCIMB8826 dans le cadre de l'allergie aux acariens. Thèse de doctorat d'état. Université libre de Bruxelles.

Sleator RD, Hill C. (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence *FEMS Microbiol Rev.* **26**(1):49-71.

Stackebrandt E and Teuber M. (1988). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie.* **70**.pp: 317-324.

Stackebrandt E, Fowler VJ, Woese CR. (1983). A phylogenetic analysis of *Lactobacilli*, *Pediococcus pentosaeus* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Systematic and Applied Microbiology.* **4**.pp: 326-337.

Stiles ME. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuw.* **70**: 331-340.

Teuber M. (1993). *Biological Fundamentals. Biotechnology vol.1*, p325. (Editeurs: Rhem HJ. Reed G). VCH. Weinheim.

Van de Guchte M, Serrero P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD and Maguin E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**.187-216.

Van Niel E, Hahn-Hagerdal B, Niel E. (1999). Nutrient requirements of lactococci in defined growth media. *617-627*.

Van der Heide T, Poolman B. Glycine betaine transport in *Lactococcus lactis* osmotically regulated at the level of expression and translocation activity, *J. Bacteriol.* (2000). **182**: 203–206.

Wouters J A, Jeynov B, Rombouts F M, de Vos WM, Kuipers OP, Abee T. (1999a). Analysis of the role of 7 kDa cold-shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 in cryoprotection. *Microbiology.* **145**: 3185-3194.

Wouters JA, Kamphuis HH, Hugenholtz J, Kuipers OP, de Vos WM and Abee T. (2000). Changes in glycolytic activity of *Lactococcus lactis* induced by low temperature. *Applied and Environmental Microbiology.* **66**:3686-3691.

Wouters JA, Rombouts FM, de Vos WM, Kuipers OP, Abee T. (1999b). Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 4436-4442.

Abstract

We studied the adaptation of the varieties of the environment which is essential in the life of the development of the bacteria.

We aimed for in this dissertation to comprehend the mechanism of the response of acid stress in the bacteria lactic.

The environmental modification leads to the survival and growth not suitable that may lead to stress. The acid stress is essential that threat the growth of the bacteria lactic. To adapt, the bacteria must have series of genetic responses.

Four mechanisms of regulation control the expression more stressed. Three of them are characterized to involve in the factor sigma B (δB) and the transcriptional repressors HrcA and CtsR. The factor δB regulate the expression the genus of stress called the class II where as the genus of stress that the expression is controlled by the regulators HrcA and CtsR appear respectively in class I and III, their transcription needs the factor δB .

In the end, these regulators intervene in the regulation of the expression of the operons gro ESL and dnaK in addition to the genus Clpp, Clpc, Clp12 and hsp18.

The expression of the genus clpx seems its role in intervene in another system of regulation not characterized in our day.

Key words: Bacteria lactic, Acid Stress, Osmotic Stress, stress response, genetic regulation.

